

# 小菜蛾化学感受蛋白基因 *PxylCSP1* 的克隆和表达

张志春, 王满囤\*, 张国安

(华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070)

**摘要:** 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到小菜蛾 *Plutella xylostella* 化学感受蛋白 (CSP) 基因 *PxylCSP1* (GenBank 登录号: FJ361903), 其核苷酸序列全长 405 bp, 编码 134 个氨基酸残基, 预测 N-末端包含 19 个氨基酸组成的信号肽序列, 估测其成熟蛋白分子量为 13.56 kD, 等电点为 6.12。该基因编码氨基酸序列和其他鳞翅目昆虫 CSP 的氨基酸序列比对同源性较高 (70% ~ 80%)。RT-PCR 结果表明 *PxylCSP1* 不仅存在于小菜蛾的触角中, 还存在于头、足、腹和翅中。Real-time PCR 结果表明 *PxylCSP1* 的表达水平因被测小菜蛾的性别、日龄、组织不同和交配与否而异。

**关键词:** 小菜蛾; 化学感受蛋白; 分子克隆; 反转录聚合酶链式反应; 实时定量聚合酶链式反应

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)02-140-07

## Molecular cloning and expression characterization of a chemosensory protein gene *PxylCSP1* from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

ZHANG Zhi-Chun, WANG Man-Qun\*, ZHANG Guo-An (College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** We described the identification and characterization of a new cDNA encoding chemosensory protein1 (CSP1) from the antenna of diamondback moth, *Plutella xylostella*, a species whose CSPs have not been identified to date. We focused our investigation on this olfactory protein family using reverse transcription-polymerase chain reaction strategies. The results showed that the CSP1 gene in diamondback moth, named *PxylCSP1* (GenBank accession no. FJ361903), is 405 bp in length and encodes 134 amino acid residues, with six cysteine residues in conserved positions relative to other known CSPs. The predicted N-terminus hydrophobic region contains 19 amino acid residues within the Has-CSP, displaying the characteristic features of a signal peptide. Thus the predicted molecular weight (MW) of the mature protein is 13.56 kD and isoelectric point (pI) is 6.12. The alignment of *PxylCSP1* showed high sequence identity (70%–80%) with other full-length sequences of other lepidoteran CSPs from GenBank. RT-PCR analysis revealed that *PxylCSP1* was not only expressed in antennae, but also in head, abdomen, wings and legs. The result of real-time PCR further indicated that the transcription level of *PxylCSP1* depended on the gender, age, mating status and tissues of the tested moths.

**Key words:** *Plutella xylostella*; chemsensory proteins; molecular cloning; RT-PCR; real-time PCR

昆虫能够感受空气中的挥发性物质,并依此作为寻偶、觅食和寻找产卵场所的信息(姜永根和程家安,2001;王桂荣等,2001)。而昆虫触角感器中的一类小分子蛋白与脂溶性的气味物质的结合,是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应(Vogt *et al.*, 1999),对于昆虫与外界进行信息交流具有重要意义。这类蛋白分为两大类:一类是气味

结合蛋白(odorant binding protein),包含普通气味结合蛋白(general odorant binding)和性信息素结合蛋白(pheromone binding protein);另一类是化学感受蛋白(chemosensory protein, CSP)。昆虫化学感受蛋白是在长期进化过程中形成的一类低分子量酸性可溶性蛋白,广泛分布于昆虫触角、跗节等各种化学感受器中,蛋白质序列具有较高的保守性,种内种间

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571505)

作者简介: 张志春,男,1981年生,博士研究生,从事昆虫生态研究, E-mail: zhichunzh@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: mqwang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received: 2008-10-22; 接受日期 Accepted: 2008-12-02

同源性一般为 30%~90%。化学感受蛋白相对分子量较小,平均 13 kD,多肽链全长约 100~115 个氨基酸,有 4 个保守的半胱氨酸位点,形成 2 个二硫键。其主要功能是感受、识别、转运、传导环境化学因子刺激信息,参与调节生理节律和生长发育。目前发现 CSPs 广泛存在于鳞翅目(Nagnan-Le *et al.*, 2000; Picimbon *et al.*, 2000, 2001; Ozaki *et al.*, 2008)、膜翅目(Danty *et al.*, 1998; Briand *et al.*, 2002; 李红亮等, 2007)、蜚蠊目(Kitabayashi *et al.*, 1998; Riviere *et al.*, 2003)、竹节虫目(Tuccini *et al.*, 1996; Marchese *et al.*, 2000)和直翅目(Angeli *et al.*, 1999)等昆虫中。

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是世界性的重要蔬菜害虫,危害严重,抗药性强,难以防治。近年来在小菜蛾的综合治理中利用其性信息素引诱防治,但具体的作用机理仍不清楚,而且目前还没有关于小菜蛾气味结合蛋白和化学感受蛋白的相关报道。我们克隆得到小菜蛾的一个化学感受蛋白基因,对小菜蛾成虫不同时期和不同组织中该基因的表达进行了研究,为研究小菜蛾的化学感受过程提供了良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试昆虫

小菜蛾为本实验室长期饲养的敏感品系,于 25 ± 1℃、光周期 16L:8D,相对湿度 60%~70%的条件下饲养,化蛹后备用。将蛹分单管在上述条件下饲养直至羽化,分雌雄切下触角后立即放于液氮中迅速冷冻后置于 -70℃ 冷藏备用,每个样品 200 根触角。同样将去触角的头、足、腹部和翅膀剪下备用。

### 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

分别取雌雄小菜蛾触角各 200 根,用液氮研磨后,参照 TRIpure(百泰克,北京)试剂盒说明书的步骤提取总 RNA。以反转录酶(RecertAid First Strand cDNA Synthesis Kit MBI Fermentas, USA)合成 cDNA 第一链;利用 TaKaRa 3'和 5'RACE 试剂盒合成 3'和 5'RACE cDNA 第一链。

### 1.3 引物设计

用 DNAMAN 软件比较已报道的鳞翅目昆虫化学感受蛋白基因的 cDNA 序列,根据保守区结合 PCR 引物设计原则设计了兼并引物(CSP1s 和 CSP1r)进行 PCR 扩增,根据 PCR 测序结果设计了 5'RACE(CSP5'outer 和 CSP5'inner)和 3'RACE(CSP3'outer 和 CSP3'inner)反应引物。再根据序列拼接结果设计了 1 对特异性引物(CSP1Rs 和 CSP1Rr)用于半定量 RT-

PCR 反应和定量 PCR 检测,内参引物为 pxylActins 和 pxylActina。引物序列如下:

CSP1s: 5'-TAYACNGAYCGNTAYGAY-3';  
CSP1r: 5'-RTCYTGYTTHATNAG-3';  
CSP5'outer: 5'-ACTCCTGCTCGTGTTGAT-3';  
CSP5'inner: 5'-CATTTGCCGCAGTTGTTT-3';  
CSP3'outer: 5'-TCCTGGTGCCGTATGTGA-3';  
CSP3'inner: 5'-AAGGAGCACATCCAAGAAGC-3';  
CSP1Rs: 5'-CACTACACCGACCGCTATGAC-3';  
CSP1Rr: 5'-ATTTGCCGCAGTTGTTCTCC-3';  
pxylActins: 5'-GCCACTTGACCGACTACC-3';  
pxylActina: 5'-GGAATGAGGGCTGGAACA-3'。

### 1.4 兼并 PCR 克隆 CSP1 片段

利用兼并引物(CSP1s 和 CSP1a)来克隆小菜蛾 CSP1 基因片段。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 60 s, 53℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化,克隆于 pMD-18T 载体内,测序,并对序列结果进行 Blast 比对分析。

### 1.5 3'和 5'RACE 克隆小菜蛾 CSP1 全长基因

根据 1.4 测序结果设计 3'和 5'RACE 引物(CSP3'outer 和 CSP3'inner; CSP5'outer 和 CSP5'inner)。根据 TaKaRa 公司的 3'和 5'RACE 试剂盒操作步骤进行 3'和 5'RACE PCR 扩增。将 3'和 5'RACE PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化,克隆于 pMD-18T 载体内,测序,并对序列结果进行 Blast 比对分析、序列拼接和同源性分析。

### 1.6 CSP1 基因的组织分布

利用 RT-PCR 技术检测小菜蛾 CSP1 基因在小菜蛾雌雄不同组织(触角、去触角头、足、腹部和翅)中的表达。特异引物: CSP1Rs 和 CSP1Ra; 扩增条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 60 s, 53℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。以小菜蛾 actin 蛋白基因(GenBank accession no.: AB282645)作为内参,其引物为 pxylActins 和 pxylActina。

### 1.7 定量 PCR 检测 CSP1 基因的时空表达

剪下羽化 0, 4, 8, 16 h 和交配(羽化后单雌单雄让其交配 16 h 后取样)小菜蛾触角 200 根,同时剪下羽化 16 h 小菜蛾雌雄虫的去触角、足、腹部和翅按 1.2 的方法提取 RNA 并合成 cDNA。特定引物用来扩增小菜蛾 CSP1 和 Actin 基因(pxylActin),以期扩增到 227 bp 和 252 bp 的片断。于 ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)用绿

色荧光蛋白法 (QuantiTect SBGR Green PCR kit; Qiagen, Beijing, China) 进行 real-time PCR, 每一样品重复 3 次。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 15 min, 94℃ 14 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环, 72℃ 5 min。给定样品被稀释到  $C_0$  (1, 4, 16, 64 和 256) 倍, 测定小菜蛾 CSP1 基因和 *pxylActin* 的  $C_t$  值, 以  $C_t$  值和  $\log C_0$  作标准曲线 (斜率 K, 截距 B), 样品的 CSP1 相对表达值为:

$$10^{\Delta C_t} \{ \Delta C_t = C_{t_{PxyLCSP1}} [ - (C_t - B)/K ] - C_{t_{PxyActin}} [ - (C_t - B)/K ] \}.$$

## 2 结果与分析

### 2.1 小菜蛾 CSP1 基因的分子克隆和 cDNA 的序列分析

兼并 PCR 克隆得到一条 200 bp 的 cDNA 片段。通过 3' 和 5' RACE PCR 我们从小菜蛾触角中克隆得到一条编码 CSP1 的 cDNA, 长度约 405 bp, 与预期大小一致。序列测定结果表明, 该基因序列读码框全长 405 bp, 编码 134 个氨基酸残基 (包括 N 端 19 个氨基酸的信号肽), 命名为 *PxylCSP1* (GenBank 登录号 FJ361903)。预测其分子量约为 13.56 kD, 等电点为 6.12, 且成熟肽中含有 4 个保守的半胱氨酸位点一为昆虫化学感受蛋白的典型标志 (图 2)。另外, 推测的氨基酸和其他鳞翅目昆虫的 CSPs 多重比较发现 4 个保守的半胱氨酸残基位置为  $C^{31}$ ,  $C^{38}$ ,

$C^{57}$  和  $C^{60}$  (图 2)。

部分鳞翅目昆虫的 CSPs 系统进化树分析将它们分成 3 组 (图 3), *PxylCSP1* 归于第 2 组 (Group2), 包括 BmorCSP4, *PxylCSP3* 和 SexiCSP4 等, 第 1 组 (Group1) 包括 BmoxCSP1, HzeaCSP, HvirCSP3, HarmCSP 和 HassCSP 等, 第 3 组 (Group3) 包括 BmorCSP5, HvirCSP1 和 MbraCSP 等。

### 2.2 *PxylCSP1* 的组织分布

利用 RT-PCR 技术检测小菜蛾 *PxylCSP1* 在不同组织中的分布, 从图 4 可以明显看出, *PxylCSP1* 不仅仅存在于小菜蛾触角中, 在其他组织中 (去触角头部、足、腹部和翅膀) 也同样有表达。

### 2.3 基于 real-time PCR 的 *PxylCSP1* 的时空表达

Real-time PCR 用来比较小菜蛾雌雄触角中 *PxylCSP1* 的转录水平。不同性别不同时间段的 cDNA 由 200 根触角的 RNA 反转录而来。未交配小菜蛾刚羽化时 *PxylCSP1* 的表达量比较低, 4 h 后迅速上升, 雌虫在 8 h 时 *PxylCSP1* 的表达量最高, 而后下降; 雄虫在 4 h 就达到最高, 而后下降; 交配后雄虫 *PxylCSP1* 的表达量明显比交配前 (羽化 16 h) 低, 而雌虫却明显比交配前 (羽化 16 h) 高 (图 5)。

从图 6 可以看出, *PxylCSP1* 在小菜蛾的触角中表达量最高, 在翅中也有很高的表达, 在去触角头部、足和腹部的表达量相对较低, 在雌虫不同组织中的表达均略低于雄虫。

1	ATGCAAAAGCTAACCTGGCTTGCTCTCTGGTGGCGGTGGCGGCGGCGGCGCGCCCC
1	M Q K L T L A C L L V A V A A A A R P
61	AACGACTCCACTACACCGACCGCTATGACAACGTGAACCTGGACGAGCTGATCTCCAAT
21	N D S H Y T D R Y D N V N L D E L I S N
121	CGGAGGCTCCTGGTGCCGTATGTGAAGTGGCTGCTGGACCAAGGCAAGTGCAGCCCGGAC
41	R R L L V P Y V K C V L D Q G K C S P D
181	GGCAAGGAGCTGAAGGAGCACATCCAAGAAGCTCTCGAGAATAACTGCGGCAAAATGCACG
61	G K E L K E H I Q E A L E N N C G K C T
241	GACAAGCAGCGCGAGGGCACCCGCAAGATGATCGGCCACCCCATCAACCAGAGCAGGAG
81	D K Q R E G T R K M I G H P I N H E Q E
301	TTCTGGGACAGCTCATCGCCAAGTACGACCCGAGAGGAAGTACGTCAGCAAGTACGAG
101	F W D Q L I A K Y D P E R K Y V S K Y E
361	AAGGAATCAAGGAGGTCAAGGCCTCATGTTGCTGGCTGGTGTA
121	K E L K E V K A S C C W L V *

图 1 小菜蛾触角 CSP1 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PxylCSP1* cDNAs from the antennae of diamondback moth *Plutella xylostella*

终止子以 \* 号表示, 下划线表示 N 端推导的信号肽。GenBank 登录号为 FJ361903。The stop codon is indicated by an asterisk. Putative signal peptides at the N-termini are underlined. GenBank accession no.: FJ361903.

```

SEXICSP2 . . . . . ABMKSMIVLCVLSVAALV . . . . . VARPDDSHYDORYDNVLDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *
PXylCSP2 . . . . . ABMKSLTLACLLVAVAAA . . . . . AARFNDSHYDORYDNVLDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *
BMORCSP5 . . . . . BAFMNSLIATCLFAVLAVA . . . . . LARFDD . . . . . KYDDRYDNVLDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *
HVIRCS3 . . . . . AA . . . . . MDKTYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . . IETGSKCTEAEKGAIVKIEHLINKELD . . . . .
BMORCSP3 . . . . . . . . . . NPMAC . . . . . VAVTW . . . . . ARPE . . . . . STYDKWYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
BMORCSP10 . . . . . ABHMKILIVVMAC . . . . . VAVTW . . . . . ARPE . . . . . STYDKWYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
HZEACSP . . . . . AANMKVLLVLCF . . . . . AA . . . . . AALADDKYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
HVIRCS2 . . . . . . . . . . AAVA . . . . . STYDKWYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
CFUMCSP3 . . . . . AARMKLLVSLLAFLVAVAF . . . . . GRPQ . . . . . NYDKWYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
BMORCSP1 . . . . . . . . . . AA . . . . . VVLADD . . . . . KYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
PXUTCSP4 . . . . . BAGHA . . . . . . . . . . TATA . . . . . MFSFS . . . . . ETVDDRYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
SEXICSP3 . . . . . ABMKMVFLVFLVLT . . . . . AVV . . . . . YSHPHSHYDORYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
SLITCSP . . . . . AAYMKVFLVLCVLA . . . . . AVV . . . . . YAHFHSHYDORYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
BMORCSP4 . . . . . . . . . . NPMKTIVCLLALTAVA . . . . . LARPE . . . . . QYDKYDITVLDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *
PXylCSP3 . . . . . ABMKNSLVLC . . . . . LALVAVA . . . . . AARPQ . . . . . ATYDKYDGVNVDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *
HARMCS2 . . . . . AAKMKVLLVLCF . . . . . AA . . . . . AALADD . . . . . KYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
BMORCSP6 . . . . . . . . . . NPMKCLTIAALL . . . . . FV . . . . . AGLSIAEKYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
HASSCSP . . . . . ABMKVLLVLCF . . . . . AA . . . . . AVLADD . . . . . KYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
MBRACSP . . . . . . . . . . AAFEEAHYDORYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
HVIRCS1 . . . . . . . . . . AAMMA . . . . . LARPDGAAYDKYN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
PXUTCSP . . . . . BAFMHTFLHVCLL . . . . . ALV . . . . . AAVSAD . . . . . QYDDRYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
SEXICSP1 . . . . . ABMKSFVLCVLCFLVAVA . . . . . HARPDSTYDORYDN INLDEILENKRLLLA . . . . . VNVMERGRMSPGDELRHQLQA . . . . .
BMANCSP3 . . . . . ACAMNSLIATCLFAVLAVA . . . . . LARFDD . . . . . KYDDRYDNVLDLSEINRRLVLPV . . . . . * * * * *

```

图2 小菜蛾 CSP1 推测的氨基酸序列和其他鳞翅目昆虫 CSPs 的同源比对

Fig. 2 Comparison of the predicted amino acid sequences of PxylCSP1 from antennae of male *Plutella xylostella* with CSPs from other Lepidopteran insects

4 个保守的半胱氨酸位点用星号“\*”标出 The four conserved cysteines are marked by asterisks (\*). SexiCSP2: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, GenBank 序列号 GenBank accession no. ABM67689; PxylCSP1: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, FJ361903; MbraCSP: 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus, AAF71291; HvirCSP: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AAM77041; HvirCSP1: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AAV34686; PxutCSP: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* L., BAF91714; SexiCSP1: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, ABM67688; BmanCSP3: 野桑蚕 *Bombyx mandarina* Moore, ACA24124; BmorCSP5: 家蚕 *Bombyx mori* L., BAF34353; PxutCSP4: 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* L., BAG71915; SexiCSP3: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, ABM67690; SlitCSP: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*, AAY26143; BmorCSP4: 家蚕 *Bombyx mori* L., NP\_001037062; PxylCSP3: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, ABM92663; HarmCSP: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner), AAK53762; BmorCSP6: 家蚕 *Bombyx mori* L., NP\_001037065; HassCSP: 烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* Guenée, ABB91378; HzeaCSP: 谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* Boddie, AAN63675; HvirCSP1: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AAV34687; CfumCSP3: 云杉色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* Clemens, AAR84079; BmorCSP1: 家蚕 *Bombyx mori* L., AAV34688; HvirCSP3: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AAM77042; BmorCSP3: 家蚕 *Bombyx mori* L., NP\_001037064; BmorCSP10: 家蚕 *Bombyx mori* L., ABH88203.

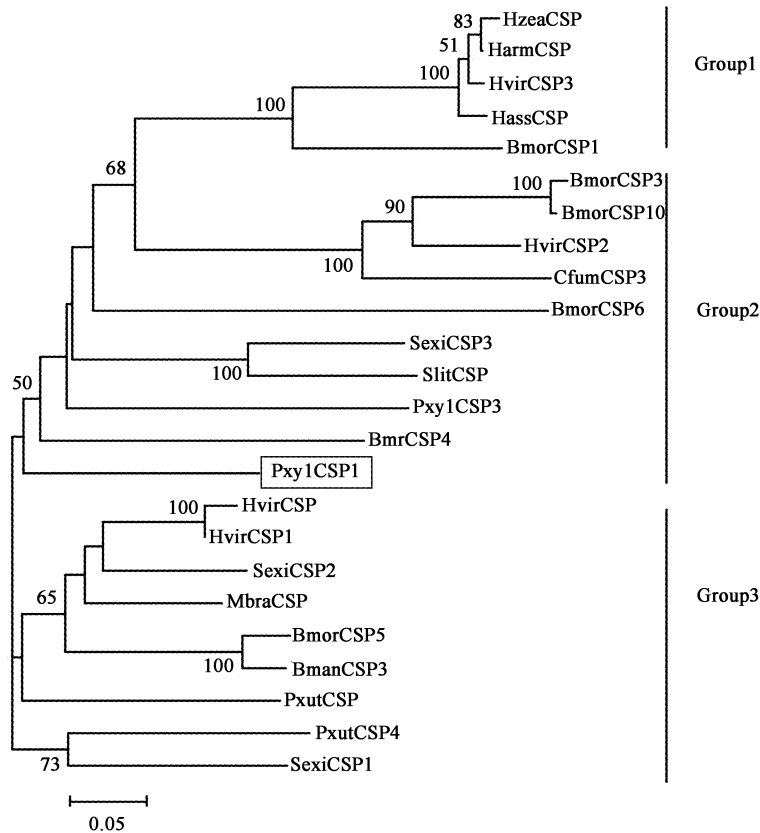
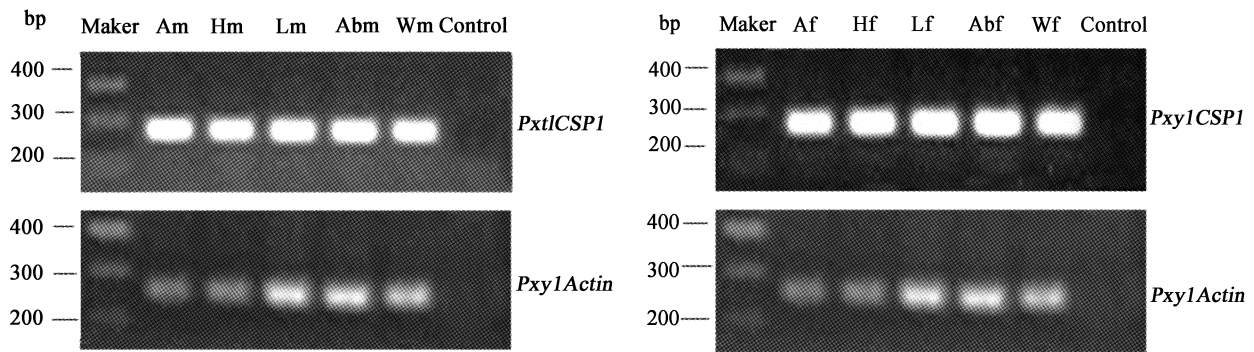


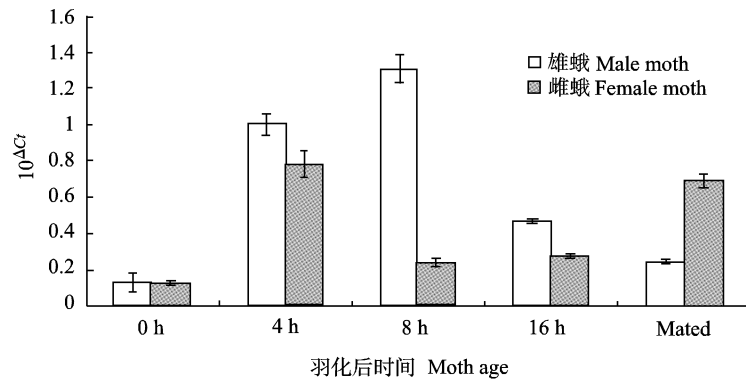
图3 小菜蛾 CSP1 和其他鳞翅目昆虫 CSPs 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of PxylCSP1 and various Lepidoptera CSPs

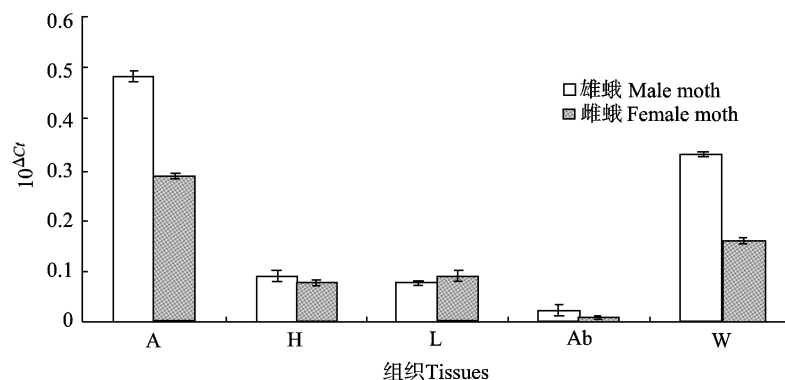
GenBank 登录号同图2。树枝上的数字代表 Bootstrap 为 1 000 次时的支持度值,根据 Picimbon 和 Gadenne (2002) 的定义将树分为 3 组 (Group1, Group2 and Group3)。GenBank accession numbers are listed in Fig. 2. Bootstrap support values (in percent) based on 1 000 replicates are indicated. Analysis indicates three groups (Group1, Group2 and Group3), as defined by Picimbon and Gadenne (2002).

图4 *Pxy1CSP1* 的组织特异性表达Fig. 4 Tissue-specific expression of *Pxy1CSP1*

Am: 雄虫触角 Male antenna; Af: 雌虫触角 Female antenna; Hm: 雄虫头部(去触角) Male head (without antenna); Hf: 雌虫头部(去触角) Female head (without antenna); Abm: 雄虫腹部 Male abdomen; Abf: 雌虫腹部 Female abdomen; Lm: 雄虫足 Male leg; Lf: 雌虫足 Female leg; Wm: 雄虫翅 Male wings; Wf: 雌虫翅 Female wings; Control: 无模板阴性对照 No template (negative control)。图7同 The same for Fig. 7. 左边标注 Marker 的分子量 DNA molecular weight marker (bp) is indicated on the left side.

图5 Real-time PCR 检测 *Pxy1CSP1* 的时空表达Fig. 5 Spatial and temporal expression of *Pxy1CSP1* in antenna by real-time PCR detection

0 h, 4 h, 8 h, 16 h 和 Mated 表示羽化后 0, 4, 8 和 16 h 及交配小菜蛾(单雌单雄交配后 16 h)。0 h, 4 h, 8 h, 16 h and Mated mean 0, 4, 8 and 16 h after eclosion and the mated moth (16 h after single female and male mated)。图中纵坐标  $10^{\Delta C_t}$  表示样品中的 *Pxy1CSP1* 相对表达值。误差线为标准误 (SE), 下同。  $10^{\Delta C_t}$  of y-axis means the relative expression level of *Pxy1CSP1* gene. The error lines in the figure mean SE. The same below.

图6 Real-time PCR 测定 *Pxy1CSP1* 在不同组织中的表达量Fig. 6 Relative quantification of *Pxy1CSP1* expressed in different tissues by real-time PCR detection

A: 触角 Antenna; H: 头部(去触角) Head (without antenna); Ab: 腹部 Abdomen; L: 足 leg; W: 翅 Wings.

### 3 讨论

迄今为止还没有关于小菜蛾化学感受蛋白的相关报道。我们利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到小菜蛾的一个化学感受蛋白基因 *PxylCSP1*, 序列分析表明 *PxylCSP1* 具有一般化学感受蛋白典型的特征(4 个保守的半胱氨酸位点, 图 2), 并且与已报道的其他昆虫的化学感受蛋白的氨基酸序列有较高的同源性。

昆虫气味结合蛋白主要是特异性地表达在触角嗅觉神经元周围的淋巴液, 极少数也可能在其他部位表达(Vogt *et al.*, 2002; 李正西和 Zhou, 2004)。相对而言, 昆虫化学感受蛋白的表达分布部位则是非常广泛。不仅能在触角表达, 而且能在身体其他部位, 如喙、足、下唇须及性腺等各部的化学感受器中表达。如烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和家蚕 *Bombyx mori* 化学感受蛋白在触角、足、头部、胸部和腹部均有表达(Picimbon *et al.*, 2000, 2001)。美洲大蠊 *Periplaneta americana* 化学感受蛋白(p-10)首先是从足中分离获得, 但也能在触角中表达(Kitabayashi *et al.*, 1998)。我们的研究也发现小菜蛾 *PxylCSP1* 不仅在小菜蛾雌雄的触角中高丰度表达, 在翅中也有较高的表达, 在其他部位(头、足和腹部)也有低丰度表达。说明小菜蛾 *PxylCSP1* 在小菜蛾身体各部分均有分布。

*PxylCSP1* 在小菜蛾体内的时空表达情况与气味结合蛋白在触角中专一性表达不同, 这可能与它们的功能有关, 因为鳞翅目昆虫主要通过触角感受外界的挥发性气味分子, 而对于化学刺激的识别除了触角外, 其他组织如足和翅等也能识别化学刺激(王桂荣等, 2005)。昆虫化学感受蛋白在身体各部分的表达分布具有全面性, 蛋白种类具有多样性, 种间种内分布具有普遍性, 而且雌雄虫中都有表达, 有别于昆虫性信息素结合蛋白主要存在于雄虫的现象, 这些特点易于适应接受复杂的环境化学刺激信息, 承担复杂的化学感受功能(刘金香等, 2005)。

Reddy 和 Guerrero(2000)研究发现小菜蛾交配雌蛾对绿叶挥发物((*Z*)-3-hexenyl acetate, (*E*)-2-hexenal 和(*Z*)-3-hexene-1-ol)的反应要比处女蛾和未交配雄蛾明显。事实上许多蛾子的嗅觉行为不仅仅依靠自然界的化学信号, 还和蛾子自身的生理状况(日龄、性别以及交配与否)和个体有关(Anton *et al.*, 2007)。例如, 交配后脐橙螟 *Amyelois transitella*

(Walker)对银杏挥发物具有明显的趋性, 而处女蛾却没有这种趋性(Phelan and Backer, 1987); 同样的现象也被发现在葡萄浆果小卷蛾 *Lobesia botrana* (Masante-Roca *et al.*, 2007) 和烟草天蛾 *Manduca sexta* (Mechaber *et al.*, 2002) 中。我们的研究表明 *PxylCSP1* 在小菜蛾不同日龄、不同性别以及交配前后的表达都不一样, 这些是否和小菜蛾可塑性行为相关还有待我们进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262: 745–754.
- Anton S, Dufour MC, Gadenne C, 2007. Plasticity of olfactory-guided behaviour and its neurobiological basis: Lessons from moths and locusts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123: 1–11.
- Briand L, Swadipani N, Nespoulous C, Bezirard V, Blon F, Huet JC, Ebert P, Penollet JC, 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry*, 269 (18): 4 586–4 596.
- Danty E, Arnold G, Huet JC, Masson C, Pernollet JC, 1998. Separation, characterization and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Chemical Sense*, 23: 83–91.
- Kitabayashi AN, Arai T, Kubo T, Natori S, 1998. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increase in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 785–790.
- Li HL, Lou BG, Cheng JA, Gao QK, 2007. Cloning, localization and expression of a cDNA encoding chemosensory protein in *Apis cerana cerana*. *Chinese Science Bulletin*, 52(8): 903–910. [李红亮, 楼兵干, 程家安, 高其康, 2007. 中华蜜蜂化学感受蛋白 cDNA 克隆、定位及其表达. 科学通报, 52(8): 903–910]
- Li ZX, Zhou JJ, 2004. Cloning, identification and expression profiling of the cDNAs of odorant-binding proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Acta Entomol. Sin.*, 47(4): 417–423. [李正西, Zhou JJ, 2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报, 47(4): 417–423]
- Liu JX, Zhong GH, Xie JJ, Guan S, Hu MY, 2005. Recent advances in chemosensory proteins of insects. *Acta Entomol. Sin.*, 48(3): 418–426. [刘金香, 钟国华, 谢建军, 官珊, 胡美英, 2005. 昆虫化学感受蛋白研究进展. 昆虫学报, 48(3): 418–426]
- Lou YG, Cheng JA, 2001. Chemical sensory mechanism of insects. *Chinese Journal of Ecology*, 20(2): 66–69. [娄永根, 程家安, 2001. 昆虫的化学感觉机理. 生态学报, 20(2): 66–69]
- Marchese S, Angeli S, Andolfo A, Scanloni A, Brandazza A, Mazza M,

- Picimbon JF, Leal WS, Pelosi P, 2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1 091 – 1 098.
- Masante-Roca I, Anton S, Delbac L, Dufour MC, Gadenne C, 2007. Attraction of the grapevine moth to host and non-host plant parts in a wind tunnel: Effects of plant phenology, sex, and mating status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122: 239 – 245.
- Mechaber WL, Capaldo CT, Hildebrand JG, 2002. Behavioral responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to hostplant volatiles change with age and mating status. *Journal of Insect Science*, 2: 1 – 8.
- Nagnan-Le P, Cain AH, Jacquin-Joly E, Francois MC, Ramashadran S, Maida R, Steinbrecht RA, 2000. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 25: 541 – 553.
- Ozaki K, Utoguchi A, Yamada A, Yoshikawa A, 2008. Identification and genomic structure of chemosensory proteins (CSP) and odorant binding proteins (OBP) genes expressed in foreleg tarsi of the swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 969 – 976.
- Phelan PL, Baker TC, 1987. An attracticide for control of *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae) in almonds. *Journal of Economic Entomology*, 80: 779 – 783.
- Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Kriger J, Breer H, Pelosi P, 2000. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44: 120 – 129.
- Picimbon JF, Dietrich K, Kriger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1 173 – 1 181.
- Picimbon JF, Gadenne C, 2002. Evolution of noctuid pheromone-binding proteins: Identification of PBP in the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 839 – 846.
- Reddy GVP, Guerrero A, 2000. Behavioural responses of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea* subsp. *capitata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6 025 – 6 029.
- Riviere S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine JP, Tegoni M, Cambillau C, Brossut R, 2003. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*: Cloning, expression and pheromone binding. *The Biochemical Journal*, 371: 573 – 579.
- Tuccini A, Maida R, Rovero P, Mazza M, Pelosi P, 1996. Putative odorant-binding protein and general odorant-binding protein in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 19 – 24.
- Vogt RG, Rogers ME, Dickens JC, Callahan FE, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24 (5): 481 – 495.
- Vogt RG, Rogers ME, Franco MD, Sun M, 2002. A comparative study of odorant binding protein genes: Differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *J. Exp. Biol.*, 205: 719 – 744.
- Wang GR, Guo YY, Xu G, Wu KM, 2001. Cloning and sequencing of a gene encoding GOBP2 in the antenna of *Spodoptera exigua*. *Scientia Agricultura Sinica*, 34 (6): 619 – 625. [王桂荣, 郭予元, 徐广, 吴孔明, 2001. 甜菜夜蛾 GOBP2 基因的克隆及序列测定. 中国农业科学, 34 (6): 619 – 625]
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2005. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding chemosensory protein in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (11): 2 233 – 2 239. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2005. 编码棉铃虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38 (11): 2 233 – 2 239]

(责任编辑: 邓艳)